[1]抗 CD20 抗体高产细胞株的筛选及质量评估

纪海姣 [1]，李文蕾 [2]，黄瑞晶 [2]，李剑 [2]，徐寒梅 [1*]
(1 中国药科大学 南京 211100 2 上海天士力药业有限公司 上海 201203)

【摘要】目的：筛选高表达单克隆细胞株，并通过优化培养基及流加物，最终达到提高目的蛋白产量及质量的目的。方法：通过有限稀释法对转染目的蛋白的CHO-S细胞进行单克隆化，应用双抗夹心ELISA方法对单克隆细胞株抗体表达量进行初步评估，最后根据筛选细胞株的活率、密度、产量及代谢情况，选择2-3株单克隆细胞进行培养条件优化，并对获得的发酵液进行纯化捕获，根据抗体蛋白表达量、糖型、等电点、纯度、酸碱峰分布等进行相应的评估分析，筛选出最优细胞株及最优培养方案。结果：经过单克隆化处理以及培养条件优化，蛋白的表达量由初始的不到500mg/L提升到2290mg/L ，且抗体蛋白纯度高达97.48%。抗体蛋白质量分析结果显示B1方案为本次实验最优培养方案。结论：通过细胞株筛选、培养基优化能显著提高抗体蛋白的产量及质量，同时对抗体蛋白糖型、等电点、纯度等均有一定程度的优化。因此工业生产中我们完全可以通过高表达克隆的筛选、培养工艺优化等对目的蛋白产量及质量进行一定程度的改善与提高，本次研究对后期实验研究及工业化方案开发都具有很好的指导意义。

【关键词】单克隆、培养基优化、质量评估

非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin’s Lymphoma,NHL)是一种血液和淋巴系统恶性肿瘤，且绝大多数成人淋巴瘤为B淋巴细胞性来源，CD20抗原是一种B淋巴细胞表面分化抗原，在95%B细胞肿瘤中均有表达，而在正常组织中不表达，因此抗CD20抗体在治疗恶性淋巴系统疾病方面具有很好的专一性[1]。Rituximab作为抗CD20抗体药物显著延长了NHL患者生存时间，但是临床研究发现仍然有部分患者对Rituximab的作用不反应或者产生耐药性，因此对抗CD20抗体类药物进行改进，提高抗CD20抗体类药物特异性，降低其免疫原性是今后抗CD20抗体药物研究的主要方向[2]。目前临床已经上市的抗CD20抗体类药物已发展到第三代，分别为第一代人鼠嵌合抗体药物Rituximab、鼠源抗体药物Tositumomab ，第二代全人源抗体药物Ofatumumab 以及第三代糖基化修饰抗CD20抗体药物Obinutuzumab[3]。本次研究是建立在对抗CD20抗体突变体Thio-2F2体外亲和活性、补体依赖的细胞毒作用(Complement Dependndent Cytotoxicity, CDC)、抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity,ADCC)以及体内抗肿瘤活性等实验的基础上，对生产工艺进行了系列优化，包括高产稳定细胞株筛选、培养

[1] 通讯作者，电子信箱：2272228935@qq.com

基及流加物优化以及抗体蛋白质量分析，以下是本次研究的全部内容。

1 材料与方法

1.1 细胞

稳定表达抗CD20抗体突变体Thio-2F2的细胞系由本实验室构建，将构建好的质粒通过电转染的方式，以300 V、一次脉冲将质粒转染入CHOS细胞株，本次实验获得转染后细胞株目的蛋白产量为451mg/L。

1.2 主要仪器

生物安全柜(Thermo，MSC-advantage 1.8)、摇床(Kuhner，ISF4-XL)、二氧化碳恒温箱(SHEL LAB，2440-2 型)、比浊仪(IMMAGE 800)、自动细胞计数仪(Inno-Alliance Biotech，Count star IC100)、生化分析仪(NOVA Plus100)、电泳仪(Bio-Rad，DYY-6B)、电泳槽(Bio-Rad，mini-sub cell GT)、凝胶成像系统(上海天能，Tanon 1600)、酶标仪(Molecular Devices，SpectraMax M5) 、定量 PCR 仪(BIO-RAD-T100)、Mabselect SuRe 蛋白纯化系统(AKTA-100)、高效液相色谱系统(Brand Aglient- Modle 200)、毛细管电泳仪(CE-MDQ)

1.3 方法

1.3.1 高产细胞株筛选

取本实验室筛选的稳定转染 pCHO1.0 质粒的细胞进行单克隆筛选，双抗夹心 ELISA(Double Antibody Sandwich-ELISA，DAS-ELISA)方法测定静置培养 14d 后单克隆细胞株产量。利用κ链的羊抗人二抗作为包被抗体，HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 片段作为检测抗体，测定表达的抗 CD20 抗体浓度。挑选单克隆上清液蛋白累积量大于 30mg/L 细胞株通过 24 孔板、6 孔板逐级放大至 24 孔深孔板，摇床 36.5℃、8%CO_2、80%RH 培养 7d，取样跟踪细胞状态，将生长状态较好细胞株放大至 50ml 摇管中培养。摇管培养 3-5d 后取样计数，当细胞活率大于 90%，按照 5×10^5cells/ml 进行 Fed-batch 产量评估。

1.3.2 培养基及流加物优化

本次研究利用 Minitab 软件的 DOE(Design of experiment,实验设计)功能，对不同细胞株以及细胞培养基及流加物，各设置 11 个实验组（编号为 A1-A11；B1-B11），每组细胞株均设立三组平行试验。当细胞活率低于 70%时，终止培养，采用免疫

速率散射比浊法测定细胞表达的 IgG 蛋白的含量。

1.3.3 抗体质量分析

1.3.3.1 抗体蛋白纯化

应用 Mabselect SuRe 对蛋白发酵液进行纯化处理(色谱柱：Hiscreen，柱高：10 cm，填柱体积 4.7mL，流速：1.43ml/min；平衡缓冲液：20mM PBS，0.15M NaCl，pH 7.0；洗脱液：50Mm 柠檬酸-柠檬酸钠，0.15M NaCl，pH 6.0)选择性将杂质物质与抗体蛋白分开。捕获后通过洗脱液将抗体蛋白从 ProteinA 上洗脱下来，获得目的蛋白，根据紫外分光光度法对纯化中间体纯度进行初步分析。

1.3.3.2 抗体蛋白纯度分析

1) SDS-PAGE

采用聚丙烯酰氨凝胶电泳技术，通过变性还原电泳以及非还原电泳分别对各组抗体蛋白纯度及分子量进行分析研究。再根据与标准品在相同条件下分离度的不同，应用统计分析软件进行线性分析，从而确定本次实验组抗体蛋白重链、轻链分子量、纯度以及抗体蛋白分子量大小。

2)HPLC-SEC

采用高效液相色谱系统进行分离纯化，流动相为 0.03M Na2HPO4+0.02M NaH2PO4+0.15M NaCl+10% Acetonitrile，PH7.0，流速为 0.8mL.min^{-1}，常温，样品稀释为 1mg.mL^{-1}，根据分子大小的不同从而实现样品的有效分离纯化，应用面积归一化法计算样品的纯度。

1.3.3.3 毛细管等电聚焦电泳(CIEF)

本次试验 CIEF-WCID 为 CE MDQ 型，将待测样本配制成 5-10 mg/mL 水溶液，取 10μL 样品与 240μLmaster mix 混合(含 12μL 两性电解质 3~10，200μL 3M urea-CIEF Gel，2μL 阳极稳定液，2μL 阴极稳定液，2μL pI markerA，2μL pI markerB，2μL pI markerC)，10000 r/min 离心 3 min 后取上清手动进样方式进样。根据样本特性设置适当的聚焦参数，用 CEInsight 软件采集 CMOS 全柱成像图并自动转换为色谱图，检测波长为 280 nm。以已知等电点的蛋白 marker 作为标准，绘制其 pI 对 MT 的标准工作曲线，计算待测样品等电点，并根据面积归一化法计算电泳谱图中样品的主峰、酸碱峰比例。

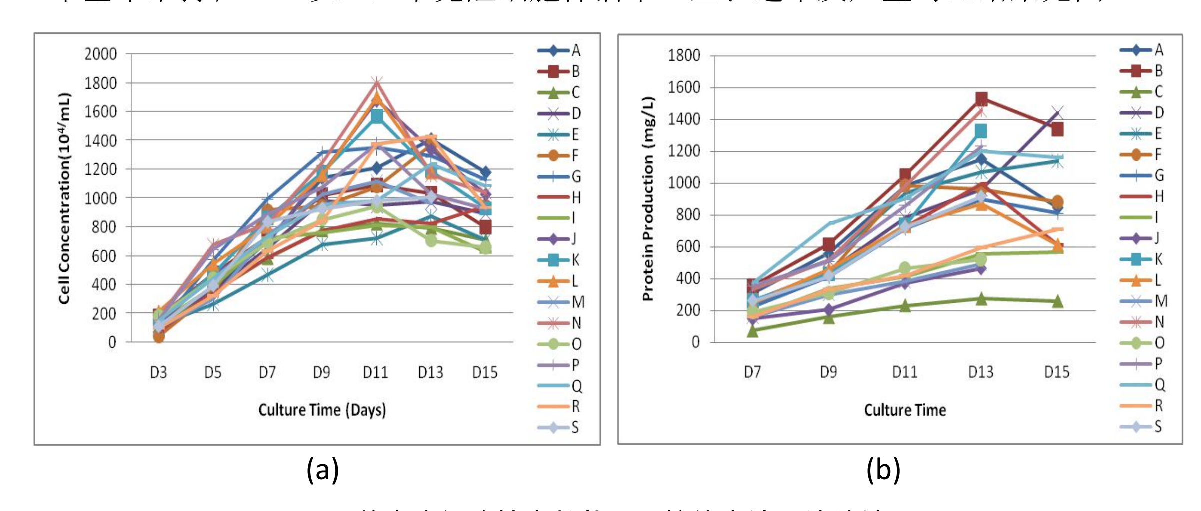
1.3.3.4HPLC-FLR 糖型分析

通过高柱效的正相层析柱(色谱柱型号：XBridge Glycan BEH Amide Column，130A，3.5μm，4.6mm*250mm；柱温：60℃；FLR 荧光检测器：激发光波长 265nm，发射光波长：425nm)对经糖苷酶酶切的游离寡糖进行分离分析，通过与标准品各个糖基峰型，保留时间比对，从而确定主要糖型、结构、分子量。

2 结果

2.1 单克隆筛选结果

采用有限稀释法，筛选出单克隆细胞株 439 株，其中产量高于 30mg/L 单克隆细胞株 135 株，最终选择 19 株单克隆进行了 Fed-Batch 培养。实验结果显示细胞株表达量最高为 1530mg/L，与原始细胞相比提高了两倍，并且细胞密度与活率也有很大程度的改善，细胞密度最高达到了 1.8×10^7cells/mL。且培养 15 天细胞活率基本维持在 95%以上，单克隆细胞株活率、生长速率及产量对比结果见图 1。



(a) (b)

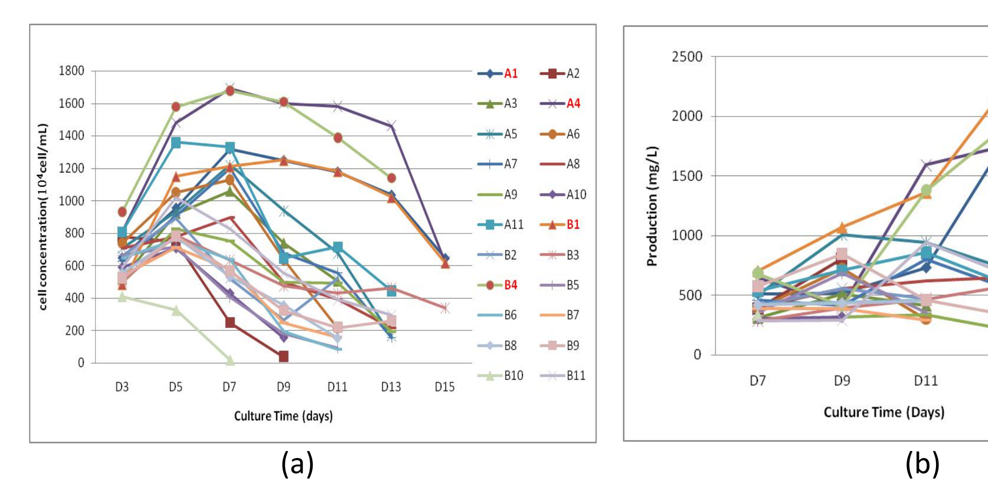
图 1 单克隆细胞株生长状况及抗体表达量统计结果

Figure1 Growth status and antibody expression of monoclonal cell lines

(a) Growth status of monoclonal cell lines; (b) Antibody expression of monoclonal cell lines; A-S are the 19 monoclonal cell lines that has been screened

2.2 培养基优化结果

根据单克隆筛选结果，对 A、B 两株细胞株进行培养工艺优化，图 2 为不同培养方案下细胞株产量、生长状况对比结果。测定结果显示 A1、A4、B1、B4 培养方案最终蛋白表达量分别为 1860mg/L、1760mg/L、2290mg/L、1950mg/L，显著高于其他各组蛋白表达量，且较优化前蛋白表达量 1440mg/L、1530mg/L 有所提高。



(a) (b)

图2 陪养基优化后细胞株生长状态及蛋白表达量

Figure2 Growth status and antibody expression of monoclonal cell lines after optimization

(a) Growth status of monoclonal cell lines after optimization; (b) Antibody expression of monoclonal cell lines after optimization; A、B are different cells; 1-11 are different cell culture and flow plus scheme

2.3 抗体蛋白质量分析结果

2.3.1 抗体蛋白纯化结果

应用 ProteinA 技术对 A1 、A4、B1、B4 培养方案发酵液进行了蛋白捕获，应用紫外分光光度计对蛋白浓度进行了初步分析，实验结果显示 B1 方案获得蛋白浓度及蛋白捕获量最高，具体结果见表 1-1。

表 1-1 ProteinA 捕获中间体抗体蛋白浓度分析

Table 1-1 The concentration of ProteinA purified intermediate

样品编号	发酵液体积(ml)	UV(OD)	浓度(mg/ml)	捕获体积(ml)	抗体蛋白产量(mg)
A1	35	0.6707	5.047	6.45	32.55
A4	30	0.8178	6.224	5.7	35.48
B1	35	1.2092	9.674	6.25	60.46
B4	30	0.9489	7.273	5.00	36.37

注：A、B 为两株不同单克隆细胞株，1、4 代表两种不同的培养基及流加物

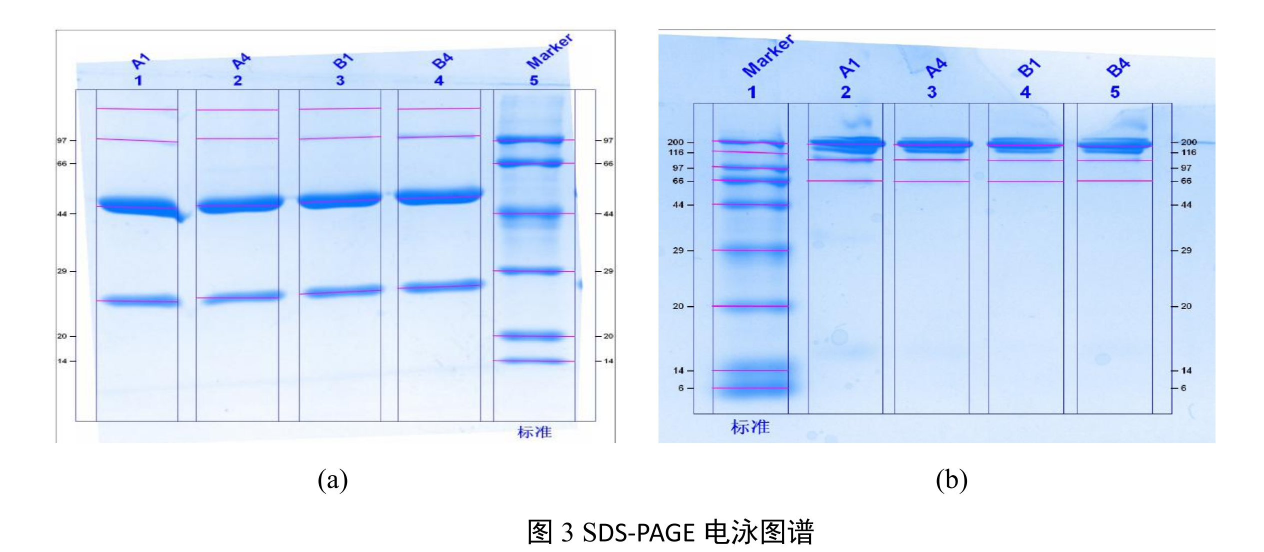
Note: A、B are different cells; 1、4 are different cell cultures and flow plus schemes

2.3.2 抗体蛋白纯度对比

2.3.2.1聚丙烯酰胺凝胶电泳实验结果

应用Quantity One软件，对四组抗体蛋白分子量、纯度按峰面积归一化法进行积分分析，电泳结果见图3。实验结果显示四组抗体蛋白分子质量介于130-150KD

之间，轻链分子量介于23-25KD之间，重链分子量介于50-55KD之间，与理论分子量相符，且四组抗体蛋白分子量均高于90%。



(a) (b)

图 3 SDS-PAGE 电泳图谱

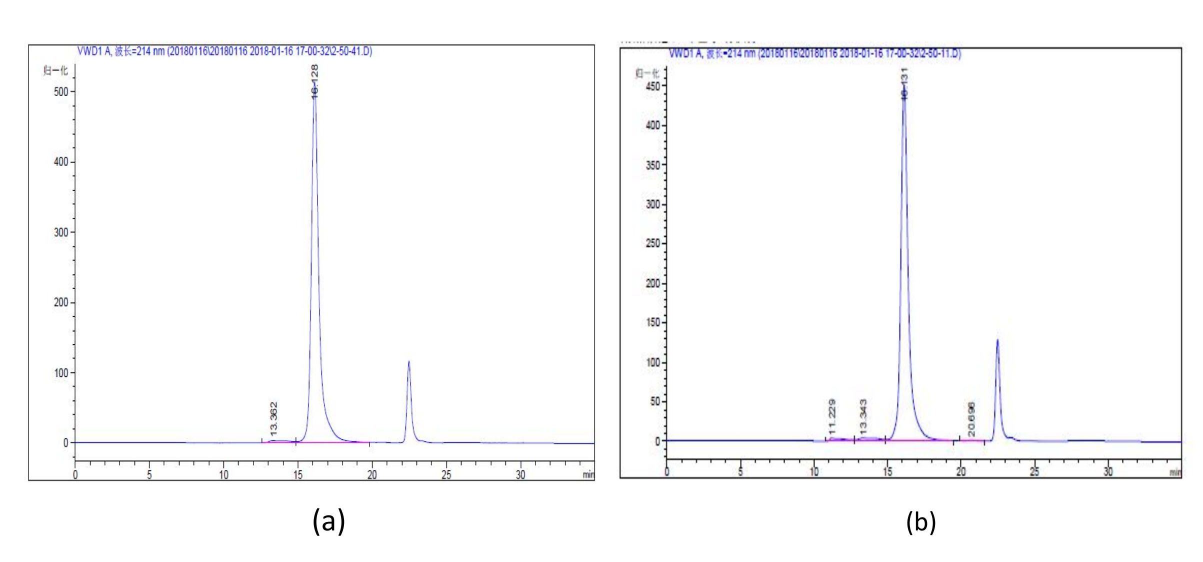
Figure3 SDS-PAGE electrophoresis map

(a) SDS-PAGE reduction electrophoresis map; (b) SDS-PAGE non-reduction electrophoresis map;

A、B are different cells; 1、4 are different cell culture and flow plus schemes

2.3.2.2 HPLC-SEC 测定结果

A1、A4、B1、B4 四组样品主峰保留时间分别为 16.131min、16.128min、16.129min、16.130min，纯度分别为 95.63%、98.23%、97.47%、92.86%均大于 90%，且 A1、B4 多聚峰面积总和分别为 3.84%、6.28%，A4、B1 多聚面积分别为 1.64%、2.25% ，据此也可以得出结论，A4、B1 纯度高于其他两组，该分析结果与电泳分析结果一致，SEC 分析图谱见图 4。



(a) (b)

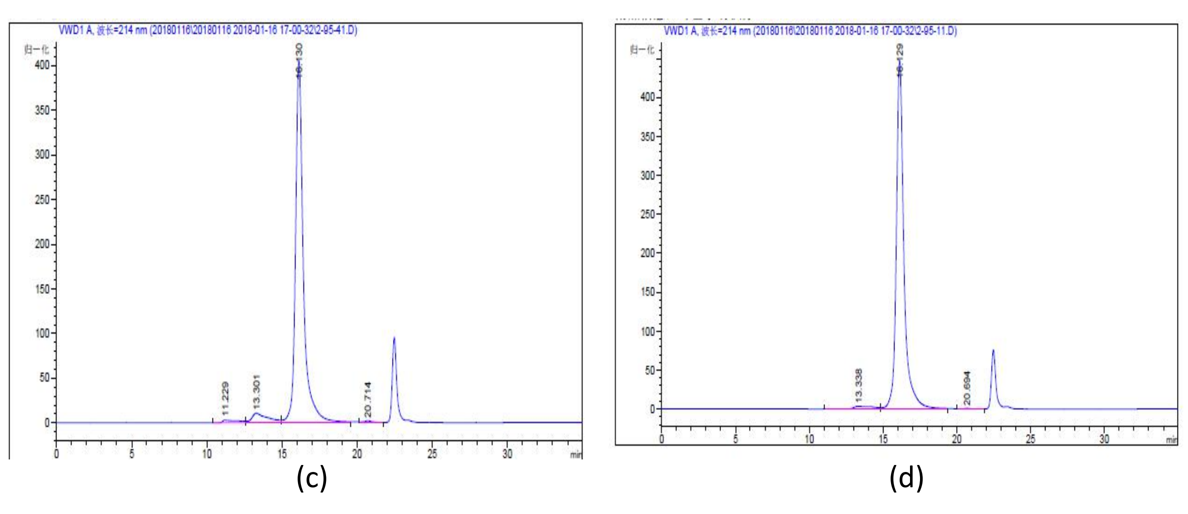


图 4 样品 SEC-HPLC 分析图谱

Figure4 The SEC-HPLC chromatograms

(a) SEC-HPLC chromatograms of Sample A1; (b) SEC-HPLC chromatograms of Sample A4; (c) SEC-HPLC chromatograms of Sample B1; (d) SEC-HPLC chromatograms of Sample B4; A、B are different cells; 1、4 are different cell culture and flow plus schemes

2.4 毛细管电泳结果

毛细管等电电泳实验结果见表 1-2，因碱峰由 C 端 Lys 引起，对药效和安全性无影响，因此可以归为主峰，CIEF 研究结果显示四组抗体等电点基本接近 8.3，与理论值接近，而且四组细胞等电点不具有统计学差异(P<0.05)。酸碱峰分析结果显示，细胞株 A4 酸式峰占峰面积的 68.57%，B4 酸式峰占峰面积的 55.14%，显著高于其他 2 组样品，这两株细胞培养基及流加物完全相同，而不同的培养条件对抗体蛋白峰型分布具有显著的影响，而酸式峰的存在有可能导致抗体蛋白药理活性的降低，因此 1 号培养基及流加物更加适目标抗体的表达。

表 1-2 毛细管电泳分析结果

Table1-2 Results of CIEF

样品	酸峰(%)	主峰(%)	碱峰(%)	主峰+碱峰(%)	等电点
A1	44.83	21.01	34.16	55.17	8.274
A4	68.57	18.79	12.63	31.42	8.332
B1	48.04	20.48	31.48	51.96	8.354
B4	55.14	28.65	16.22	44.87	8.377

注：A、B 为两株不同单克隆细胞株，角标 1、4 为不同培养基及流加物。

Note: A、B are different cells; 1、4 are different cell cultures and flow plus schemes.

2.5 HPLC-FLR 糖型分析结果

HPLC-FLR 糖型分析结果见图 5，参考对照品糖型对四组发酵液糖型进行分析，

分析结果显示四组发酵液 G0、G0F 糖型含量 A4 显著低于其他三组，而其余各组含量无统计学差异(P<0.05)，且均高于 50%。本研究四组抗体蛋白 G1、G1F、G2F 均为含有半乳糖修饰糖型，且 B1 蛋白发酵液半乳糖含量最高。并且糖型分析结果显示只有 B1 抗体蛋白含有 1.166%唾液酸修饰，而且四组抗体蛋白中核心岩藻糖修饰的抗体含量均在 85%以上，而无核心岩藻糖修饰糖型可接受范围为 2%-13%[9]，本次研究抗体蛋白糖型分布正好在这一范围之内，具体糖型分析结果见表 1-3。

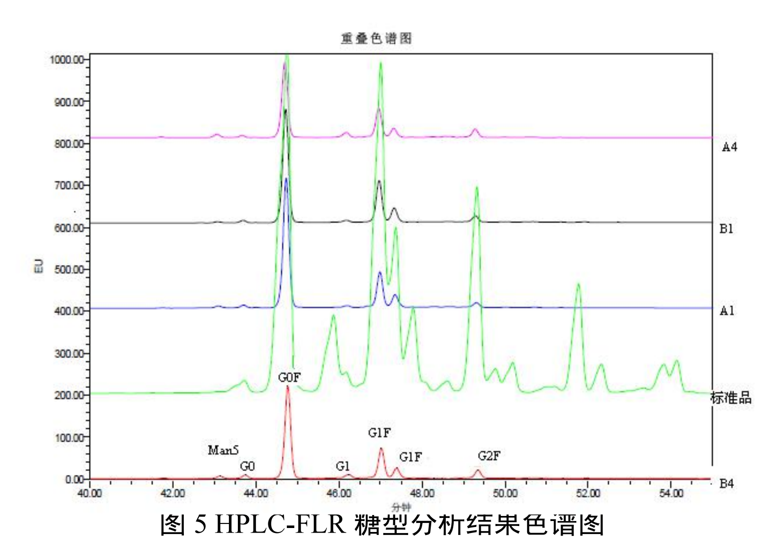


图 5 HPLC-FLR 糖型分析结果色谱图

Figure5 Chromatogram of glycosylation analysis of HPLC-FLR

表 1-3 HPLC-FLR 糖型分析结果(%)

Table1-3 Results of glycosylation analysis of HPLC-FLR

	峰 4	峰 5	峰 7	峰 8	峰 9,10	峰 17
样品	Man5	G0	G0F	G1	G1F	G2F
A1	1.37	1.84	61.24	2.48	25.42	3.32
A4	2.71	1.89	51.93	4.7	28.28	6.97
B1	0.73	1.47	57.39	2.3	30.04	4.82
B4	1.79	2.52	56.79	3.56	26.46	6.42
Mean	1.65	1.93	56.84	3.26	27.55	5.38
Std.Dev	0.83	0.44	3.82	1.11	2.04	1.65
CV(%)	50.32	22.57	6.72	34.04	7.40	30.65

注：A、B 为两株不同单克隆细胞株，角标 1、4 为不同细胞培养基及流加物。

Note: A、B are different cells; 1、4 are different cell cultures and flow plus schemes.

3 讨论

CHO细胞表达系统具有基因易操作性，并且完全可以通过抑制DHFR或者GS活性筛选得到目的基因稳定的单克隆细胞株，并进行基因拷贝数扩增[4]，而且CHO细

胞系在悬浮培养过程中活率及细胞密度均较高，有利于抗体蛋白表达[5]，因此本实验选用CHOS细胞进行蛋白表达。在本研究筛选过程96孔板单克隆ELISA酶标检测结果产量高的细胞株最终表达量并不是最高的，例如本次研究中2-71号单克隆细胞株，前期ELISA测定产量为49mg/L，但最终抗体表达量仅为564mg/L，而细胞株2-95前期ELISA测定抗体表达量为32.93mg/L，但最终抗体表达量为1530mg/L，这一结果可能与不同细胞株最适培养基成分、培养温度、CO_2、湿度、摇床振幅、转速不同有关。针对这一问题，可以扩大单克隆筛选数量，尤其是初始筛选过程中产量居于中等偏上水平单克隆细胞株数量。

Thio-2F2 是一种全人源抗体蛋白，抗体药物的人源化降低了抗体药物的免疫原性，提高了抗体药物的特异性，从而提高了抗体药物治疗靶向性，降低了其毒副作用。通常在筛选到高水平表达的细胞克隆之后，要采取各种方式来优化细胞培养工艺，以获得更高的蛋白产量。常用的提高蛋白表达水平的技术手段有优化培养基成分、降低细胞培养温度、加入丁酸钠、DMSO 等，但是针对每一个细胞培养个例，不同的方法起到的作用是不一样的，需要综合考虑[6]。本次实验经培养方案初步优化后抗体产量提高到了 2290mg/L，初步推断 B1 方案为本次实验最优方案。但是由于抗体本身具有结构复杂性、作用机制多样性以及生产工艺的复杂性，因此需采用多种质量控制方法对蛋白进行评价。

大量研究资料显示，IgG糖基化修饰对抗体蛋白CDC、ADCC活性、半衰期以及抗炎等药理、毒理活性具有显著的影响[7]。例如半乳糖的存在可提高抗体与C1q的结合能力，进而使IgG的CDC效应增强，但对IgG ADCC活性几乎无影响。唾液酸含量的增高会导致抗体ADCC活性的下降，但是少量的唾液酸有助于增加抗体蛋白的抗炎作用，有研究显示完全去除唾液酸的抗体蛋白，抗炎作用也会消失[8]。无核心岩藻糖修饰抗体与FcrRIIIa的亲和力显著增加，因而导致抗体ADCC活性增加，而无核心岩藻糖修饰糖型可接受范围为2%-13%[9]。

本实验从蛋白表达量考虑B1方案显然为最优方案，而根据蛋白纯度、酸碱峰分析结果A1、B1方案抗体蛋白纯度显著优于其他两组方案。根据抗体蛋白糖型分析结果B1方案表达抗体蛋白不仅能够保证较高的CDC、ADCC活性，而且含有少量的唾液酸修饰糖型，能够保证抗体蛋白具有一定的抗炎活性，因此B1方案更适合Thio-2F2抗体表达。综上所述，通过单克隆筛选获得高产单克隆细胞株，并对培养方案进行优化，对目标蛋白纯度、糖型、酸碱峰、等电点等理化特性进行一系列改善，获得产量高、生长状态好的细胞株及较优的培养方案。本实验也在一定程度上提高了生物制品产量、简化了工艺，为今后相关研究及生产奠定了很好的基础。

【参考文献】

[1] Zhang JD, Zhang GY, Shi ML, etal. Progress of CD20's biological function[J]. Lett Biotechnology, 2009, 9(20): 227-229.

[2] Kang HJ, Lee SS, Kim KM, etal. Radioimmunotherapy with (131)I-rituximab for patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma(NHL)[J]. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology, 2011, 7(2): 136-145.

[3]邓承莲，邹佳，宋海峰．抗CD20治疗性单克隆抗体的研究进展[J]．药学学报, 2013, 48(10): 1515-1520.

[3]Deng CL, Zou J, Song HF. Advances in anti-CD20 therapeutic monoclonal antibodies[J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2013, 48(10): 1515-1520.

[4] Ruth Hausmann, Ivana Chudobová, Holger Spiegel, etal . Proteomic analysis of CHO cell lines producing high and low quantities of a recombinant antibody before and after selection with methotrexate [J] . Journal of Biotechnology, 2018, 265(10): 65-69.

[5]JJ Cacciatore, LA Chasin, EF Leonard. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 673-681.

[6]宋小红，于婷，李冰，等．促进 CHO 细胞生长及其产物 hNGF 表达的培养条件的初步研究[J]．中国生物工程杂志, 2010, 30(4): 13-19.

[6]Song XH, Yu T, Li B, etal. To promote the development of CHO cell growth and its Hngf expression[J]. China Biotechnology, 2010, 30(4): 13-19.

[7]Beck A, Wagner Rousset E, Ayoub D, etal. Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. Biotechnology program, 2013, 85(2): 715-736.

[8]衣常红，高春芳. IgG 糖基化修饰及其意义研究进展[J]．中国免疫学杂志, 2010, 26(11): 1051-1056.

[8]Yi CH, Gao CF. The glycosylation of IgG and its significance of the research about glycosylation[J]. Journal of Chinese immunology, 2010, 26(11): 1051-1056.

[9]Takaha Shi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, etal . Core fucose and bisecting GLcNAc , the direct modifiers of the N-glycan core: Their functions and target proteins[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(12): 1387-1390.

Anti-CD20rh MAb Quality Evaluation And Monoclonal Cell Line Screening

JI Hai Jiao[1], LI Wen Lei[2], Huang Rui Jing[2], LI Jian[2], XU Han Mei[1]
(1China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China)
(2 Biomedical research and development center, Tasly Academy, Tianjin 300410, China)

【Abstract】Objective: To screen high expression monoclonal cell lines and optimize the production and quality of Anti-CD20rh MAb. Method: Screen high expression monoclonal cell lines by finite dilution method, and evaluated the yield of monoclonal cell lines by double-sandwich ELISA. In order to screen the best cell culture program, we picked two to three cells based on the cells' growth state, yield, viability, and so on. We evaluated the results by the sugar type, the isoelectric point, the purity and the distribution of the acid and alkali base peak. Result: The production of CHOS cells tripled after a series of optimization, increased from nearly 500mg/L to 2290mg/L. After the optimization of culture program, the purity of the target protein reached up to 97.48%, and the distribution of the acid and alkali base peak looks more close to the ideal state. Conclution: In this research we optimized the production and quality of the target antibody by cloning and culture optimization, these results are of great significance to the later experimental research and industrial production .

【Key Words】Monoclonal, Medium Optimization,Quality Evaluation